

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

REC'D 10 FEB 2005

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/PEA/416)	
Demande internationale No. PCT/FR 03/03665	Date du dépôt international (jour/mois/année) 10.12.2003	Date de priorité (jour/mois/année) 13.12.2002
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N1/20		
Déposant INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPE..., et al.		



- Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
- Ce RAPPORT comprend 6 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.

☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 5 feuilles.

- Le présent rapport contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- I ☒ Base de l'opinion
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 06.04.2004	Date d'achèvement du présent rapport 09.02.2005
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Trommsdorff, M N° de téléphone +49 89 2399-7361 

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR 03/03665

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport.)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration			
Nouveauté	Oui:	Revendications	8
	Non:	Revendications	1-7, 9-11
Activité inventive	Oui:	Revendications	8
	Non:	Revendications	1-7, 9-11
Possibilité d'application industrielle	Oui:	Revendications	1-11
	Non:	Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

1. Documents cités

- D1: DRANCOURT MICHEL ET AL: "16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates." JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 38, no. 10, octobre 2000 (2000-10), p.3623-30, ISSN: 0095-1137
- D2: FARROW JOHN A E ET AL: "Phylogenetic interrelationships of round-spore-forming bacilli containing cell walls based on lysine and the non-spore-forming genera Caryophanon, Exiguobacterium, Kurthia, and Planococcus." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, vol. 44, no. 1, 1994, p.74-82, ISSN: 0020-7713
- D3: FRUEHLING ANJA ET AL: "Exiguobacterium undae sp. nov. and Exiguobacterium antarcticum sp. nov." INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY, vol. 52, no. 4, juillet 2002 (2002-07), p.1171-6, ISSN: 1466-5026
- D4: DATABASE EMBL [Online] Exiguobacterium acetylicum 16S rRNA gene 10 juillet 1995 (1995-07-10), NAKAGAWA ET AL.: extrait de EBI Database accession no. D55730
- D5: US-A-6 022 537 (GARCIA JEAN-LOUIS ET AL) 8 février 2000 (2000-02-08)

2. **Concernant le point V**

Déclaration motivée quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

- 2.1. La présente demande ne remplit pas les conditions énoncées dans l'article 33(1) PCT, l'objet des revendications 1-6 n'étant pas conforme au critère de nouveauté défini par l'article 33(2) PCT.

La demande a pour objet une souche bactérienne désignée *Exiguobacterium lactigenes* sp. nov. caractérisée par sa séquence ARN ribosomal 16S et son utilisation pour la production de lactate.

Le document D1 décrit la classification d'une large collection de bactéries par le séquençage de leur ARN ribosomal 16S.

Le clone 18 (déposé sous le no. AF227839) présente 98.2% d'identité sur 1492 nucléotides avec la séquence revendiquée et est donc destructeur de nouveauté pour l'objet des revendications 1-3 et 6 (Art. 3(2) PCT). Le fait que dans la revendication 1 le genre de la souche bactérienne est précisé être *Exiguobacterium lactigenes* ne représente pas une vraie caractéristique

technique, qui suffirait à différencier ladite souche de l'art antérieur, étant donné qu'il s'agit là d'une désignation arbitraire donnée par les inventeurs.

D2 analyse les séquences ARNr 16S de différentes espèces bactériennes et les compare avec d'autres espèces connues. Entre autre l'ARNr 16S d'*Exiguobacterium aurantiacum* est séquencé, la séquence présente 97.4% d'identité avec la séquence revendiquée et est donc destructrice de nouveauté pour l'objet des revendications 1-3 et 6 (Art. 33(2) PCT).

D3 divulgue les séquences ARNr 16S de quatre espèces bactériennes différentes. Le clone H2T est caractérisé par un ARNr 16S ayant 93.8% d'identité avec la séquence revendiquée et détruit donc la nouveauté des revendications 1, 2 et 6 (Art. 33(2) PCT).

L'ARNr 16S du clone d'*Exiguobacterium acetylicum* divulgué dans D4 est 93.6% identique à la séquence revendiquée et détruit donc aussi la nouveauté des revendication 1, 2 et 6 (Art. 33(2) PCT).

Les revendications 4, 5 et 7 dépendent de la revendication 1 et englobent donc, elles aussi, n'importe quelle souche bactérienne s'hybridant sur quelques nucléotides avec la séquence ID No. et présentant en plus une des caractéristiques techniques indiquées. Il est certain qu'un grand nombre de souches décrites dans D1-D4 présente de façon implicite ces caractéristiques: ces revendications manquent donc également de nouveauté (Art. 33(2) PCT). Une limitation à un haut degré d'identité avec la séquence ID No.1 suffirait à rétablir la nouveauté.

D5 décrit une souche bactérienne ayant des propriétés très similaires à la souche revendiquée (t° optimale, pH optimum, etc.), mais du genre *Lactobacillus*. D5 décrit par ailleurs l'utilisation de cette souche thermotolérante pour la production d'acide lactique.

Au vu de D5, les méthodes des revendications 9-11 manquent d'activité inventive (Art. 33(3) PCT).

2.2. Au vu des documents cités ci-dessus, la souche revendiquée à la revendication 8 représente une nouvelle souche du genre *Exiguobacterium*.

Bien qu'elle soit caractérisée par un ARNr 16S présentant une forte homologie avec celui d'autres souches de l'art antérieur, aucun des documents cités ne

suggère l'existence de cette nouvelle souche.

La revendication 8 est donc nouvelle et inventive (Art. 33(1)-(3) PCT).

- 2.3. L'objet des revendications 1-11 a une application industrielle dans le domaine agronomique (Art. 33(4) PCT).

PCT/FR03/03665

14

REVENDECATIONS

1/ Souches bactériennes, caractérisées en ce qu'il s'agit d'*Exiguobacterium* du genre *lactigenes* et qu'elles possèdent une séquence d'ADN dont au moins une partie est capable de s'hybrider avec de l'ADN génomique ou plasmidique de la souche déposée le 5 décembre 2002, sous le n° I-2962, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.).

2/ Souches bactériennes selon la revendication 1, caractérisées en ce qu'au moins 70 % de leur génome est capable de s'hybrider avec l'ADN de la souche déposée.

3/ Souches bactériennes selon la revendication 1 ou 2, caractérisées par la séquence SEQ ID N°1 de l'ARNr 16S :

GCCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGCCGCTCTGAACCTTCGGGGGGACGACGGTGGAATGAGCGGC
GGACG
GGTGAGTAACACGTAAAGAACCTGCCCATAGGTCTGGGATAACCCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGTGTC
ATCGG
ACCGCATGGTCCGCTGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCGCCCATGGATGGCTTTGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGG
GGTAA
CGCCCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGCCCCAGA
CTCCT
ACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGC
TTTCG
GGTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCGAGGCAATGGCGGCACCTTGACGGTACCTTGCGAGAA
AGCCA
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGC
GCGCA
GGCGGCCTCTTAAGTCTGATCTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCATTGAGTA
TAGGA
GAGAAGAGTGGAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCCTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCT
TTGGC
CTATAACTGACGCTGAGGCTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAAC
GATGA
GTGCTAGGTGTTGGAGGGTTCCGCCCCCTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTCGGGAGTACGGT
CGCAA
GCCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCCAAG
AACCT
TACCAACTCTTGACATCCCCGTGACCGGTACAGAGATGTACCTTCCCCTTCGGGGGCGAGGGGTGACAGGTGGTGC
ATGGT
TGTGCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGSETTAAGTCCCCGAACGAGCGCAACCCCTGTCTTAGTTGCCAGCAT
TnAGT
TGGGCACCTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATG
AGTTG

PCT/FR03/03665

15

GGCTACACACGTGCTACATGGACGGTACAAAGGGCAGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAGCCGTT
CTCAG
TTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAA
TACGT
5 TCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGCACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCGTAAGG
AGCCA
GCCCGCGAAGGTGGGGCAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCCGCTGA

ou une séquence ayant une similitude avec SEQ ID N°1
10 supérieure à 97%.

4/ Souches bactériennes selon l'une quelconque des
revendications 1 à 3, caractérisées en ce qu'elles sont
thermotolérantes, saccharolytiques et amylolytiques et/ou
capables de produire du L(+)lactate.

15 5/ Souches selon l'une quelconque des revendications 1
à 4, caractérisées par des propriétés de croissance à des
températures de l'ordre de 40 à 50°C, à un pH de 5,4 à 9,15,
avec un optimum pour la croissance à 45°C, à un pH de 7
environ.

20 6/ Souches bactériennes selon l'une quelconque des
revendications 1 à 5, caractérisées par une teneur de leur ADN
en guanine et cytosine de 50 mole% environ.

7/ Souches bactériennes, caractérisées en ce qu'il
s'agit d'*Exiguobacterium* du genre *lactigenes* et qu'elles
25 possèdent une séquence d'ADN dont au moins une partie est
capable de s'hybrider avec de l'ADN génomique ou plasmidique
de la souche déposée le 5 décembre 2002, sous le n° I-2962, à
la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes
(C.N.C.M.), ces souches étant thermotolérantes,
30 saccharolytiques et amylolytiques et/ou capables de produire
du L(+)lactate, ayant des propriétés de croissance à des
températures de l'ordre de 40 à 50°C, à un pH de 5,4 à 9,15,
avec un optimum pour la croissance à 45°C, à un pH de 7
environ, et une teneur de leur ADN en guanine et cytosine de
35 50 mole% environ.

PCT/FR03/03665

16

8/ Souche bactérienne déposée à la C.N.C.M. le 5 décembre 2002, sous le numéro I-2962.

5 9/ Procédé de culture de souches bactériennes selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'on opère dans des conditions anaérobies facultatives, à un pH de 5,4 à 9,15 environ, à 37°C, en particulier de 6,5 à 7,5, dans un milieu de base contenant un sucre utilisable par ces souches comme source d'énergie.

10 10/ Application des souches bactériennes selon l'une des revendications 1 à 8, dans des procédés de fermentation alimentaire.

11/ Procédé de production de métabolites tels que le L(+) lactate, caractérisé en ce qu'il comprend

15 - la culture d'une souche bactérienne selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 dans des conditions appropriées pour son développement et pour la production du métabolite recherché,

20 - la récupération des métabolites produits, l'isolement du métabolite désiré et sa purification.

PCT/FR03/03665

1

SOUCHES BACTERIENNES DU GENRE *EXIGUOBACTERIUM*
 PROCEDE DE CULTURE ET APPLICATIONS

L'invention a pour objet de nouvelles souches du genre *Exiguobacterium*.

Elle vise également un procédé de culture de ces souches,
 5 ainsi que leurs applications industrielles.

L'invention se rapporte plus particulièrement à des souches bactériennes telles qu'isolées d'échantillons provenant de systèmes hydrothermaux marins profonds.

10 Dans Journal of Clinical Microbiology, vol 38, n°10, October 2000, p.3623-30, Drancourt et al rapportent les résultats de l'étude d'une collection de 177 isolats de sources diverses et de leur identification sur la base des ARNr.

15 Mais les espèces données de ce tableau sont très éloignées des souches de l'invention.

Dans l'article paru dans International Journal of systematic bacteriology, vol 44, n°1, 1994, p. 74-82, Farrow et al décrivent des études comparatives entre différentes
 20 espèces. Le genre *Exiguobacterium* est mentionné, mais aucune précision n'est donnée sur les espèces.

L'article de Frühling et al dans International Journal of systematic and evolutionary microbiology, vol 52, n°4, juillet 2002, p.1171-6, on rapporte des souches de *Exiguobacterium*
 25 *undae* sp.nov. et de *Exiguobacterium antarcticum* sp.nov. isolées à partir de l'eau de mares.

Ces souches et les autres espèces du genre *Exiguobacterium* données ont des positionnements phylogénétiques très éloignés des souches de l'invention.

30 Le document Data base EMBL, n° d'accension D 55730, donne l'ARNr 16 S d'un clone d'*Exiguobacterium acetylicum*, ce qui

PCT/FR03/03665

1a

correspond aussi à une espèce différente de celle de l'invention.

Ces documents rapportent respectivement, la séquence de l'ARNr 16 S de *Exiguobacterium auriantiacum* (NDCDO 2321) et de *Exiguobacterium undae*. Les commentaires donnés ci-dessus en rapport avec le document Data base s'appliquent également.

L'étude par les inventeurs des échantillons prélevés les a conduit à isoler une nouvelle espèce d'*Exiguobacterium* présentant des propriétés de grand intérêt dans divers domaines de l'industrie.

L'invention a donc pour but de fournir des souches de cette nouvelle espèce.

Elle vise également à fournir des protocoles de culture de ces souches précisant les conditions physico-chimiques et la composition du milieu de culture qui permettent de produire favorablement des cellules et/ou certains métabolites, plus particulièrement du L(+) lactate.

Selon un autre aspect, l'invention vise l'utilisation directe de ces souches ou celle de leurs métabolites dans divers domaines de l'industrie.

Les souches bactériennes de l'invention sont caractérisées en ce qu'elles possèdent une séquence d'ADN dont au moins une partie est capable de s'hybrider avec de l'ADN génomique ou plasmidique de la souche déposée le 5 décembre 2002, sous le n° I-2962, à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (C.N.C.M.), 25 rue du Docteur Roux, 75015 PARIS.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.